

(inv. US 5,186,894)

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN(11)Publication number : **04-157365**(43)Date of publication of application : **29.05.1992**

(51)Int.Cl.

G01N 31/22
G01N 31/00
G01N 33/84(21)Application number : **02-282316**(71)Applicant : **FUJI PHOTO FILM CO LTD**(22)Date of filing : **20.10.1990**(72)Inventor : **KATSUYAMA SHUNKAI****(54) DRY ANALYSIS ELEMENT FOR ANALYZING IRON ION**

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable analysis which is high in sensitivity, free from interference of interfering ions and excellent in ion selectivity and quickness by maintaining pH within a specific range when used in pH buffer.

CONSTITUTION: A dry analysis element for analyzing iron ion comprises a detecting reagent layer 12 and a pre-processing layer 14 laminated on a light permeable support 10. The pre-processing layer 14 comprises a water penetrating layer and contains chelating agent which is specifically coordinated in Cu ions. The reagent layer 12 comprises a water penetrating layer and contains chelate reagent Nitro-PAPS excellent in detection sensitivity and cation compounds. A pH buffer is contained wherein pH is maintained in a range of 3.0 to 5.0 when used in either of the above layers or in other layers to prevent Zn ions from forming complex with the reagent Nitro-PAPS. The chelating agent and the pH buffer of the pre-processing layer 14 are used to eliminate interfering ions such as Cu ions and Zn ions respectively, and analysis is free from the ions while excellent ion selectivity can be obtained.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

⑫ 公開特許公報(A)

平4-157365

⑮ Int. Cl.⁹G 01 N 31/22
31/00
33/84

識別記号

1 2 1 G
T

庁内整理番号

9015-2G
9015-2J
7055-2J

⑬ 公開 平成4年(1992)5月29日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全11頁)

⑭ 発明の名称 鉄イオン分析用乾式分析要素

⑯ 特 願 平2-282316

⑰ 出 願 平2(1990)10月20日

⑱ 発 明 者 勝 山 春 海 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式
会社内
⑲ 出 願 人 富士写真フイルム株式 神奈川県南足柄市中沼210番地
会社
⑳ 代 理 人 弁理士 山田 文雄 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

鉄イオン分析用乾式分析要素

2. 特許請求の範囲

- (1) ①キレート試薬Nitro-PAPS及びカチオン性化合物を含有する検出試薬層と、
②第二銅イオンに特異的に配位するキレート剤とを含有する前処理層とを、
備え、前記いずれかの層または他の層に、使用時にpHを3.0から5.0の範囲に維持するためのpH緩衝剤が含有されていることを特徴とする鉄イオン分析用乾式分析要素。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は水性液体中の鉄イオンを分析するための乾式分析要素に関するものである。特に、第二銅イオン(Cu²⁺)や第一亜鉛イオン(Zn²⁺)の共存下で第一鉄イオン(Fe³⁺)を分析するのに適した鉄イオン分析用乾式分析要素に関するものである。

(従来技術)

血液、血漿、血清及び尿等の生物体液中の鉄イオン含量を分析する方法が知られている。例えば、貧血、肝障害又は鉛中毒等の臨床検査においては、ヒト血清中の鉄イオンを分析することが広く行われている。

鉄イオン含量の分析には原子吸光法が精度・感度の上でもっとも優れている。しかしこの方法は、特殊な装置と時間と熟練を要し、実験室や病院等で分析するのには適していない。臨床検査等で一般に広く行われている鉄イオン分析は、鉄イオンと錯体形成をして呈色するキレート化合物を比色法により測定するキレート分析法である。

鉄イオンと錯形成するキレート剤としては、第一鉄イオン(Fe³⁺)と錯形成するキレート剤が多く知られている。近年Fe³⁺イオン検出用のキレート剤の開発進歩には著しいものがある。従来知られていた0-フェナンスロリン(0-phenanthroline)やその類似構造化合物のフェロジン(Ferrozine)などがFe³⁺イオンとの錯形成して示すモル分子吸光係数が $1 \sim 3 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ であったのに対

し、柴田他により開発されたビリジルアゾ化合物誘導体(分析化学、23、1412-1430、(1974))では錯形成により $7 \sim 10 \times 10^{-4} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を超えるモル吸光係数を示すに至り、第一鉄イオンの検出感度は著しく高まっている。

このような高検出感度のキレート剤の出現により、従来広く行われていたいわゆる湿式法から、より簡便な構成で簡易に分析できる乾式法での分析が試みられるようになってきた。いわゆる湿式法とは、使用する試薬を先ず水性溶媒に溶解して試薬溶液を作り、この試薬溶液を分析試料に加えて、生じた呈色反応生成物を比色計で測定するものである。これに対し、乾式法は、試薬組成物を乾燥状態で含有させた試験片、分析スライド、分析テープ等の乾式分析要素に、水性試料を直接点着して、要素内で生じた呈色をそのまま比色測定するものであり、溶液試薬を用いる湿式法に比べ、操作の簡便性と分析の迅速性に優れている。

このような鉄イオン分析用乾式分析要素としては、特開昭64-21368号に記載されたもの

がある。

乾式法における第一鉄イオン分析に要求されるのは、

- 1) 第一鉄イオン-キレート錯体染料のモル吸光係数が十分に高く、分析感度が十分であること。
- 2) 錯形成反応が迅速であり、乾式分析法の長所である簡便性・迅速性を損なわないこと。
- 3) 妨害イオンに対する選択性が高いこと。一般に第一鉄イオンと錯形成するキレート化合物は第二銅イオン(Cu^{2+})や第一亜鉛イオン(Zn^{2+})とも錯形成し呈色する。ちなみに健康なヒトの血清中には、 Fe^{2+} では $90 \sim 180 \mu\text{g/dl}$ 、 Cu^{2+} では $100 \sim 200 \mu\text{g/dl}$ 、 Zn^{2+} では $90 \sim 120 \mu\text{g/dl}$ 存在し、いずれも同程度ある。従って、ヒト血清を試料として第一鉄イオン分析をする場合にはこれらの妨害イオンに対する選択性が重要となる。

前記した従来技術、特開昭64-21368号に記載の乾式分析要素では、鉄(Fe^{2+})キレート剤として、ビリジルアゾ化合物を使用している。このビリジルアゾ化合物は油溶性キレート剤であ

り、これを極性イオンが浸透可能な高誘電率のカブラ溶剤(オイル)に組込み、共存する Cu^{2+} イオンや Zn^{2+} イオンの干渉を排除することを試みている。しかしながら、実使用条件下のpH(4~5)では、これら妨害イオンの干渉を十分に排除できない。そのため、 Cu^{2+} イオンを予め除去するためネオキュプロインのようなキレート剤を併用している。しかしこの場合でも、実使用条件下のpHで比較的高い吸光係数を示す錯体を形成する Zn^{2+} イオンの干渉を十分に排除することはできない。

又この従来技術では、キレート剤が油溶性であるので、親水性イオンである Fe^{2+} イオンとの反応が遅くなるという問題が生じていた。

(発明の目的)

本発明はこのような事情に鑑みなされたものであり、高感度で、かつ、 Cu^{2+} イオンや Zn^{2+} イオンなどの妨害イオンに干渉されずイオン選択性に優れ、さらに Fe^{2+} イオンとの反応が早く迅速性にも優れた鉄イオン分析用乾式分析用を提供すること

を目的とする。

(発明の構成)

本発明のこの目的は、

- ①キレート試薬 Nitro-PAPS 及びカチオン性化合物を含有する検出試薬層と、
- ②第二銅イオンに特異的に配位するキレート剤とを含有する前処理層とを、

備え、前記いずれかの層または他の層に、使用時にpHを3.0から5.0の範囲に維持するためのpH緩衝剤が含有されていることを特徴とする鉄イオン分析用乾式分析要素、

により達成される。

本発明による鉄イオン分析用乾式分析要素は、基本的には、第一鉄イオン(Fe^{2+})の分析に使用される。しかしながら、上記前処理層に第二鉄イオン(Fe^{3+})を第一鉄イオン(Fe^{2+})に還元する還元剤を含有させれば、第一鉄イオンの分析にも、第二鉄イオンの分析にも使用できる。又この場合には、 Fe^{2+} イオンと Fe^{3+} イオンの両者の総量としての鉄イオン含量を分析することもできる。

(作用)

本発明では、 Fe^{2+} イオンと錯形成して呈色するキレート試薬として、非常に高いモル吸光係数を有し、検出感度に優れたNitro-PAPS〔化学名2-(5-Nitro-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfo propylamino)phenol disodium salt, dihydrateの略称〕(CAS Registry No. 113516-70-4)を使用する。

本発明では、使用時のpHを3.0～5.0の範囲に維持することにより、妨害イオンである Zn^{2+} イオンの干渉を排除する。一方もう一つの妨害イオンである Cu^{2+} イオンは Cu^{2+} イオンに特異的に配位するキレート剤とを含有する前処理層により除去される。

さらに、検出試薬層に含有されたカチオン性ポリマーは、Nitro-PAPSが検出試薬層から前処理層に移行して前処理層で Cu^{2+} イオンと錯形成するのを防止する。

(発明の構成の詳細な説明)

1) 分析要素の基本層構成

の上に、さらに展開層20が積層される。

第3図は第3実施態様の分析要素を示す。この実施態様では、検出試薬層12はキレート試薬Nitro-PAPS含有する呈色試薬層12Aと、カチオン性化合物を含有する拡散防止層12Bとの2層で構成される。

上記各層間は、実質的に流体接触しており、本要素に点着された生体試料液中の低分子成分は自由に各層間を行き来できる。ただし検出試薬層に含有されたNitro-PAPSは、後記するように、カチオン性化合物の存在により検出試薬層から他の層へ拡散することはできない。

なお各層には必要に応じて、硬化剤、界面活性剤、緩衝剤等を含有させる。又層間には接着層等を設けてもよい。

以下各層の構成を説明する。

2) 展開層

展開層は、要素に供給される液体の量にほぼ比例した面積に液体を展開する、いわゆる計量作用(metering作用)を有する層であり、多孔性層に

第1図に本発明の免疫分析要素の一実施態様を示す。

この図において符号10は光透過性支持体であり、その上には検出試薬層12、前処理層14が積層されている。

前処理層14は、水浸透性層で構成され、第二銅イオンに特異的に配位するキレート剤を含有し、水性液体試料中の妨害イオンの一つ、 Cu^{2+} イオンを捕獲・除去する。好ましい実施態様では、前処理層はさらに、 Fe^{2+} イオンを還元する還元剤を含有する。

検出試薬層12は、水浸透性層で構成され、キレート試薬 Nitro-PAPS 及びカチオン性化合物を含有する。

これらいずれかの層には、使用時にpHを3.0から5.0の範囲に維持するpH緩衝剤が含有される。好ましくは、Nitro-PAPSと Fe^{2+} イオンとの錯体形成が起さる検出試薬層12にpH緩衝剤を含有される。

第2図は、第2実施態様を示し、前処理層14

より構成される。

この多孔性展開層は繊維質であってもよいし、非繊維質であってもよい。

繊維質多孔性展開層としては、特開昭55-164356、特開昭57-66359等に記載の織物布地展開層、特開昭60-222769等に記載の編物布地展開層、特開昭57-148250に記載の有機ポリマー繊維バルブ含有抄造紙展開層、特開昭57-125847に記載の繊維と親水性ポリマーの分散液を塗布して形成した展開層等がある。

非繊維質の多孔性展開層としては、特公昭53-21677、米国特許3,992,158、等に記載のメンブランフィルター層(ブラッシュポリマー層)、ポリマーマイクロビーズ等の微粒子が親水性ポリマバインダーで点接触状に接着されてなる連続微空隙含有等方的多孔性展開層(三次元格子状粒状構造物層)展開層等の非繊維等方的多孔性展開層などがある。

展開層としては、これらのうち織物布地、編物布地などが特に好ましい。織物布地などは特開昭

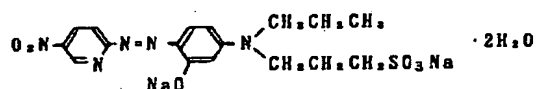
57-66359号に記載されたようなグロー放電処理をしてもよい。展開層には、展開面積、展開速度等を調節するため、特開昭60-222770（対応：EP 0162301A）、特開昭63-219387（対応：西独特許公開 DE 37 17 913A）、特開昭63-112999（対応：DE 37 17 913A）、特開昭62-182652（対応：DE 37 17 913A）に記載したような親水性高分子あるいは界面活性剤を含有させてもよい。

3) 検出試薬層

検出試薬層 1 2 にはキレート試薬 Nitro-PAPS 及びカチオン性化合物が含有される。

3-1) Nitro-PAPS

Nitro-PAPS は下記構造式を有する化学名、2-(5-Nitro-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfo-propylamino)phenol disodium salt, dihydrate の略称である（CAS Registry No. 113516-70-4）。



Nitro-PAPSと静電的に結合し、Nitro-PAPSが検出試薬層 1 2 以外の他の層（特に前処理層）へ拡散するのを抑制する。もしNitro-PAPSが検出試薬層の上にある前処理層 1 4 へ拡散・移行すると、Nitro-PAPSは前処理層 1 4 にトラップされていた Cu^{2+} イオンと錯体形成して Fe^{3+} -Nitro-PAPS錯体と似た吸収スペクトルを与えることになり、ノイズの原因となる。カチオン性化合物は、これを防止して Fe^{3+} -Nitro-PAPS錯体の検出効率を高める。

このよう本発明におけるカチオン性化合物は、Nitro-PAPSが前処理層 1 4 への拡散・移行を防止するものであるから、必ずしも、Nitro-PAPSと同一の層に含有させなくてもよい。第3図に示すようにNitro-PAPSを含有する呈色試薬層 1 2 B の上層に、拡散防止層 1 2 A として、カチオン性化合物を含有した別の層を積層してもよい。この場合、検出試薬層 1 2 は呈色試薬層 1 2 B と拡散防止層 1 2 A との2層から構成されることになる。

本発明に用いることができるカチオン性化合物

本化合物は、アゾ基のバラ位の両端に電子吸引基と電子供与基を持ち、極性構造を取りやすい化合物で、金属との錯形成により鋭敏な呈色変化をもたらす。各金属と錯体形成する pH 領域、吸収極大波長 λ_{max} 、モル吸光係数 ϵ を以下に示す。

金属	pH	λ_{max}	モル吸光係数 ϵ ($\times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
Fe(II)	3~7.5	562	10.7
Cu(II)	2~5.0	566	7.1
Zn(II)	7.5~9.0	566	15.0

本発明では、使用時の pH を 3.0 ~ 5.0 に維持する pH 緩衝剤を使用する。従って、 Zn^{2+} 錯体の形成は防止できる。

一方、 Cu^{2+} はこの pH 領域で錯形成が可能であるが、本発明では後記する Cu^{2+} 特異的キレート剤により除去されることになる。

3-2) カチオン性化合物

カチオン性化合物は、アニオン性化合物である

としては、第4級アンモニウム基を含む低分子化合物及びポリマー化合物（分子量 5,000 ~ 200,000、特に 10,000 ~ 50,000）がある。

カチオン性低分子化合物の例としては、テトラベンジルチメチルベンジルアンモニウムクロライド、トリオクチルメチルアンモニウムクロライド、トリブチルアンモニウムクロライド等がある。

カチオン性ポリマー化合物としては以下のものがある。

米国特許 2,548,564、同 2,484,430、同 3,146,062、同 3,756,814、特開昭 52-136626 等に開示されているビニルピリジニウムカチオンポリマー；

米国特許 3,625,694、同 3,859,096、同 4,128,538、同 3,756,814、英国特許 1,277,453 等に開示されているゼラチン等と架橋可能なポリマー；

米国特許 3,958,985、同 2,721,852、同 2,798,063、特開昭 54-115228、同 54-145529、同 54-126027 等に開示されている水性ゾル型カチオン性

ポリマー；

米国特許3,958,008、特開昭55-33172に開示されている水不溶性カチオン性ポリマー；

米国特許4,168,976（特開昭54-137333）に開示されている、染料と共有結合を行うことができる反応性媒染剤；

さらに、米国特許3,709,690、同3,788,855、同3,642,482、同3,488,706、同3,557,066、同3,271,147、同3,271,148、特開昭50-71332、同53-30328、同52-155528、同53-125、同53-1024等

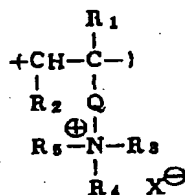
に開示されているカチオン性ポリマーを挙げることができる。

その他、米国特許2,675,316、同2,882,156に開示されているカチオン性ポリマーも挙げることができる。

これらの内、親水性コロイド層から他の層に移動しにくいものが好ましく、例えば、ゼラチン等の親水性コロイドと架橋反応するもの、水不溶性カチオン性ポリマー、及び水性ソル（又はラテックス分散物）を好ましく用いることができる。

ネット）との反応生成物。

一般式（I）



R₁：H、アルキル基

R₂：H、アルキル基、アリール基

Q：2価基

R₃, R₄, R₅：アルキル基、アリール基、またはR₃～R₅の少なくとも2つが結合してヘテロ環を形成してもよい。

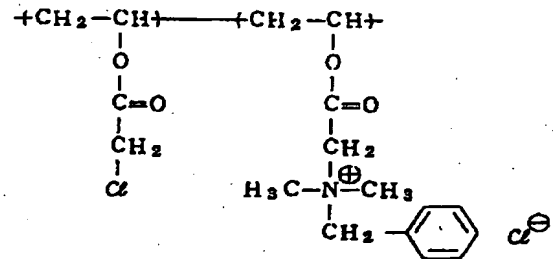
X：アニオン

（上記のアルキル基、アリール基は置換されたものも含む）

特に好ましいカチオン性ポリマーを以下に示す。

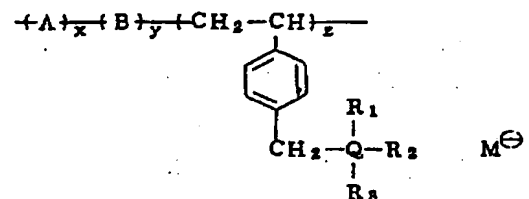
(1) 4級アンモニウム基をもち、かつゼラチンと共有結合できる基（例えばアルデヒド基、クロロアルカノイル基、クロロアルキル基、ビニルスルホニル基、ビリジニウムプロピオニル基、ビニルカルボニル基、アルキルスルホノキシ基等）を有するポリマー、

例えば、



(2) 下記一般式（I）で表されるモノマーの繰り返し単位と他のエチレン性不飽和モノマーの繰り返し単位とからなるコポリマーと、架橋剤（例えばビスアルカンスルホネート、ビスアレンスルホ

(3) 下記一般式（III）で表されるポリマー一般式（III）



x：約0.25～約5モル%

y：約0～約90モル%

z：約10～約99モル%

A：エチレン性不飽和結合を少なくとも2つもつモノマー

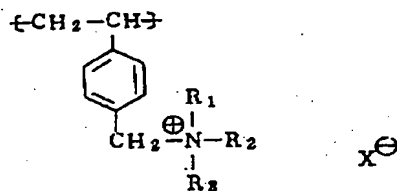
B：共重合可能なエチレン性不飽和モノマー
Q：N

R₁, R₂, R₃：アルキル基、環状炭化水素基、またR₁～R₃の少なくとも2つが結合して環を形成してもよい。

（これらの基や環は置換されていてもよい）

(4) 下記一般式 (IV) で表される繰り返し単位を
1/3 以上有する水不溶性ポリマー

一般式 (IV)



$\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$; それぞれアルキル基を表し、
 $\text{R}_1 \sim \text{R}_3$ の炭素数の総和が12以上のもの
(アルキル基は置換されていてもよい)。

X ; アニオン

その他の特に好ましいカチオン性ポリマーとし
ては、特開昭53-89796 (対応米国特許4,069,017)
に記載の以下のものがある。

1) ポリ (N,N,N-トリメチル-N-ビニルベンジルア
ンモニウムクロリド

[Poly(N,N,N-trimethyl-N-vinyl benzyl-
ammonium chloride)]

2) スチレン-[ベンジル (ジメチル-p-ビニルベン
ジルアンモニウムクロリド)] コポリマー

[Poly(styrene-co-benzyl-(dimethyl)-p-vinyl
benzylammonium chloride)]

3) スチレン-[(ビニルベンジル) - (トリヘキシ
ル) アンモニウムクロリド] コポリマー

[Poly(styrene-co-(vinylbenzyl)-(triethyl)-
ammonium chloride)]

4) (N,N,N-トリメチル-N-ビニルベンジルアンモ
ニウムクロリド)-スチレンコポリマー

[Poly(N,N,N-trimethyl-N-vinylbenzyl-
ammonium chloride-co-styrene)]

5) スチレン-(N-ビニルベンジル-N,N-ジメチルベ
ンジルアンモニウムクロリド)-ジビニルベンゼ
ンコポリマー

[Poly(styrene-co-N-vinyl-benzyl-N,N-
dimethylbenzylammonium chloride-co-
divinylbenzene)]

3-3) 検出試薬層の層材料

検出試薬層の水浸透性を確保するためには、前
記展開層の説明で述べたような多孔性媒体からな
る多孔性層としてもよいが、親水性ポリマーバイ
ンダーを使用するのがより好ましい。

親水性ポリマーバインダーからなる水浸透性層
で検出試薬層を構成する場合、使用できる親水性
ポリマーとしては、例えば、以下のものがある。
ゼラチン及びこれらの誘導体 (例えばフタル化ゼ
ラチン)、セルロース誘導体 (例えばヒドロキエ
チルセルロース)、アガロース、アルギン酸ナト
リウム、アクリルアミド共重合体、メタアクリ
ルアミド共重合体、アクリルアミド又はメタアクリ
ルアミドと各種ビニル性モノマーとの共重合体、
ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリビニ
ルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアク
リル酸ナトリウム、アクリル酸と各種ビニル性モ
ノマーとの共重合体などである。

親水性ポリマーバインダーで構成される検出試
薬層は、特公昭53-21677号 (対応米国特許 3,992

,158)、特開昭55-164356号 (対応米国特許 4,292
,272)、特開昭54-101398号 (対応米国特許 4,132
,528)、特開昭61-292063号 (Chemical Abstracts
105, 210567y) 等の明細書に記載の方法に従っ
て、Nitro-PAPS、カチオン性化合物その他の試薬
組成物と親水性ポリマーを含む水溶液又は水分散液
を支持体又は吸水層等の他の層の上に塗布し乾燥
することにより設けることができる。親水性ポリ
マーをバインダーとする検出試薬層の乾燥時厚さ
は約2 μm ~ 約50 μm 、好ましくは約4 μm ~ 約
30 μm の範囲、被覆量では約2 g/m^2 ~ 約50 g/m^2 、
好ましくは約4 g/m^2 ~ 約30 g/m^2 の範囲である。

検出試薬層にはNitro-PAPS、カチオン性化合物
の他に、塗布特性、拡散性化合物の拡散性、反応
性、保存性等の諸性能の向上を目的として、界面
活性剤、pH緩衝剤組成物等、を加えることがで
きる。

4) 前処理層

前処理層14には、第二銅イオン (Cu^{2+}) に特
異的に配位するキレート剤が含有される。また第

二鉄イオン (Fe^{2+}) を還元する還元剤を併せて含有させてもよい。

前処理層は、水浸透性層で構成され、前記検出試薬層と同様の層材料で構成することが出来る。そのうち、親水性ポリマーバインダーからなる実質的に非孔質の層とするのが好ましい。

4-1) Cu^{2+} 特異的キレート剤

Cu^{2+} イオンが検出試薬層で Nitro-PAPS と反応するのを防止するため、予め前処理層に捕獲するのに使用する。

Fe^{2+} とは配位せず、 Cu^{2+} イオンと特異的に配位するものであれば、公知のキレート剤を使用することができる。ただし、一般的にキレート剤は錯形成により呈色するものが多いから、 Cu^{2+} との錯体の吸収スペクトルが、 Fe^{2+} -Nitro-PAPS 錯体の吸収スペクトルとできるだけ重ならないものが望ましい。少なくとも、比色測定波長では Cu^{2+} -キレート錯体の吸収がないか、無視できる程度に吸収が少ないことが好ましい。

このような Cu^{2+} 特異的キレート剤としては、例

えば、

バソクプロイン (Basocuproine)

$$\lambda_{\text{max}} = 479\text{nm}, \quad \epsilon = 1.4 \times 10^4 (\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$$

バソクプロインスルホン酸ナトリウム (Basocuproine disulfonic acid, disodium salt)

$$\lambda_{\text{max}} = 483\text{nm}, \quad \epsilon = 1.2 \times 10^4 (\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$$

ネオクプロイン (Neocuproine)

$$\lambda_{\text{max}} = 454\text{nm}, \quad \epsilon = 8 \times 10^4 (\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$$

等が挙げられる。

このようなスペクトルの重なりが無視できない場合には、検出試薬層と前処理層との間に光遮蔽層を設けて、 Cu^{2+} -キレート錯体の呈色を遮蔽してもよい。

この光遮蔽層は、検出試薬層で生じた Fe^{2+} -Nitro-PAPS 錯体の呈色を透光性支持体側から反射漏光する際に、前処理層での Cu^{2+} -キレート錯体の呈色を遮蔽するばかりでなく、分析要素に点着された試料の色（特に試料が全血である場合にはヘモグロビンの赤色等）を遮蔽すると共に、光反射層又は背景層として機能する。光遮蔽層は、皮

膜形成能を有する親水性ポリマーをバインダーとして、二酸化チタン、硫酸バリウムなどの白色光反射性微粒子がほぼ一様に分散された水浸透性の層であることが好ましい。バインダーとしてはゼラチン、ゼラチン誘導体、ポリアクリルアミド等が好ましい。又このような独立した光遮蔽層を設ける代わりに、前処理層自体に酸化チタン等の微粒子を含有させて光遮蔽機能を併せ持たせるようにしてもよい。

4-2) Fe^{2+} 還元剤

試料中の第二鉄イオン (Fe^{2+}) を、Nitro-PAPS と錯形成可能な第一鉄イオン (Fe^{3+}) に還元するためのものである。たとえば、血清中のトランスフェリンに保持される鉄イオンは三価の Fe^{3+} であり、本発明の分析要素の使用時の pH でトランスフェリンから解離されることになっても、Nitro-PAPS とは結合し得ない。このような場合に、 Fe^{2+} 還元剤により、分析要素内で第一鉄イオン (Fe^{3+}) に変換させて分析することができる。従って、本発明の分析要素は、 Fe^{2+} イオンのみを分析する

だけでなく、 Fe^{2+} イオン含量を分析したり、さらに Fe^{2+} イオンと Fe^{3+} イオンの総量である全鉄イオン量を分析することもできる。勿論、 Fe^{2+} イオンのみを含有する試料液でも本発明の分析要素は分析可能である。その場合には、 Fe^{2+} 還元剤は必須ではない。しかし、しばらく時間をあけてから他の試料液と共に分析されることが多く、その放置している間に生体試料液等では、 Fe^{2+} から Fe^{3+} に自然酸化されることもある。従って、 Fe^{2+} イオンのみを含有すると考えられる試料を分析する場合でも、 Fe^{2+} 還元剤を前処理層に含有させる方が好ましい。

還元剤としては、公知の適当なものを使用することが出来る。よく知られた還元剤として、たとえば、ヒドキシルアミン塩酸、パラメチルアミノサルフェート、アスコルビン酸、アスコルビルバルミチン酸がある。

なおこの還元剤は、 Fe^{2+} が Nitro-PAPS 含有層に達する前に Fe^{3+} を還元処理できるように Nitro-PAPS 含有層よりも上層にあれば十分であり、前記

した Cu^{2+} 特異的キレート剤とは別の層に含有させてもよい。

5) 支持体

支持体10としては光不透過性(不透明)、光半透過性(半透明)、光透過性(透明)のいずれのものも用いることができるが、一般的には光透過性で水不透過性の支持体が好ましい。

光透過性水不透過性支持体の材料として好ましいものはポリエチレンテレフタレート、ポリスチレンである。親水性層を強固に接着させるため通常、下塗り層を設けるか、親水化処理を施す。

6) pH緩衝剤

実使用時のpHを、キレート試薬Nitro-PAPSが Zn^{2+} との錯体形成を殆ど起こさず、かつ Fe^{3+} とは錯体形成をするようなpH領域(3.0~5.0)にするために使用する。ちなみに600nmにおける Zn^{2+} 錯体と Fe^{3+} 錯体との検出効率は約1:100である。これにより、 Zn^{2+} イオンの干渉を十分に排除することができる。

なお、血清トランスフェリンに結合している

Fe^{3+} を十分に早い速度で解離させるためにはpH 4.0~5.0にすることが必要である。この場合には、本発明におけるpH緩衝剤はpH 4.0~5.0のものを使用すればよい。

pH緩衝剤は、キレート試薬Nitro-PAPSが第一鉄イオンと反応する場である検出試薬層又は呈色試薬層のpHが、使用時にpH 3.0~5.0、好ましくは約4.0~約5.0となるように、これらの層に含有される。しかし、水性試料溶液により他の層から輸送されるpH緩衝剤であっても、検出試薬層のpH領域を希望のものにすることができる。従って、このpH緩衝剤は検出試薬層以外の他の層、例えば、前処理層、展開層、光反射層、或いはpH緩衝剤のみを含有する独立の層として設けられた水浸透性層に含有させてもよい。

用いうるpH緩衝剤の例としては、日本化学会編「化学便覧 基礎編」(東京、丸善、1966年発行)1312-1320頁、R.M.C. Dawson et al編、「Data for Biochemical Research」第2版(Oxford at the Clarendon Press, 1969年発行)

476-508頁、「Biochemistry」5, 467-477頁(1966年)、「Analytical Biochemistry」104, 300-310頁(1980年)に記載のpH緩衝剤系がある。

pH約3.0からpH約5.0の範囲のpH緩衝剤の具体例としてトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)を含む緩衝剤；燐酸塩を含む緩衝剤；硼酸塩を含む緩衝剤；クエン酸又はクエン酸塩を含む緩衝剤；グリシンを含む緩衝剤；リン酸；琥珀酸；マロン酸；酒石酸；グルタル酸；バルビツール酸；安息香酸；シュウ酸；フマル酸；マレイン酸；3,3-ジエチルグルタル酸；N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン(Bicine)；N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPES)；及びこれらのいずれかと必要により組合せられる酸、アルカリ又は塩がある。好ましい緩衝剤の具体例として、リン酸；琥珀酸；マロン酸；酒石酸；グルタル酸；3,3-ジエチルグルタル酸；燐酸二水素カリウム-燐酸水素二ナトリウム；Tris-燐酸ナトリウム；Tris-硼酸ナトリウム-EDTA-2Na塩；Tris-

クエン酸；酢酸-酢酸ナトリウム；クエン酸二水素ナトリウム；Bicine；HEPESなどがある。

7) 分析要素の製造方法

本発明の乾式分析要素は前述の諸特許明細書に記載の公知の方法により調製することができる。

本発明の分析要素は一辺約15mmから約30mmの正方形またはほぼ同サイズの円形等の小片に裁断し、特公昭57-28331(対応米国特許4,169,751)、実開昭56-142454(対応米国特許4,387,990)、特開昭57-63452、実開昭58-32350、特表昭58-501144(対応国際公開: WO 83/00391)等に記載のスライド枠に収めて化学分析スライドとして用いることが、製造、包装、輸送、保存、測定操作等の観点で好ましい。使用目的によっては、長いテープ状でカセットまたはマガジンに収めて用いたり、または小片を開口のあるカードに貼付または収めて用いることなどでもできる。

8) 分析方法

本発明の乾式分析要素は、ヒト、動物等の生体液中の鉄イオン、特に第一鉄イオンを定性的及び

定量的に分析するために使用出来る。測定試料としては、全血、血漿、血清、リンパ液、胆汁、尿、脊髄液、唾液、汗、及び便分泌物等を挙げられるが、これらに限定されない。骨格筋、心臓、腎臓、肺臓、脳、脊髄、皮膚等のヒトまたは動物組織の液体標本を分析することもできる。

本発明の要素は、前述の諸特許明細書等に記載の操作と同様の操作により液体試料中の鉄イオンの定量分析ができる。

例えば約5 μ l ~ 約200 μ l の適当な量の水性液体試料液を基質層14に点着し、一定温度で一定時間置いた後、要素内の発色又は変色を光透過性支持体側から反射測光する。予め作成した検量線を用いて比色測定法の原理により検体中の鉄イオンの量を求めることができる。点着する液体試料の量、インキュベーション時間及び温度を一定にすることにより定量分析を高精度に実施できる。

測定操作は特開昭60-125543、同60-220862、同61-294367、同58-161867(対応米国特許 4,424,191)などに記載の化学分析装置により極めて容易な操

作で高精度の定量分析を実施できる。

なお、目的や必要精度によっては、目視により発色の度合いを判定して、半定量的な測定を行なってもよい。

また試験片の形に成形した分析要素を試料溶液に直接浸漬して反応させ、結果を定性的に読み取るようにしてもよい。

(実施例1)

次の表1に示す構成の血清鉄イオン分析用乾式分析用を作成した。

なお、表中の最右欄の数値は好ましい塗布量の範囲を示す。

(以下余白)

表 1

		g/m ²	
		塗布量	好適範囲
展開層	50%~44相当のポリスチレンアクリレート紡糸糸を36ゲージ編みにしたトリコット編物布地(厚さ約250 μ m)		
接着層	脱イオンゼラチン	2	1~5
前処理層	ポリビニルピロリドン(パイパー) (平均分子量約120万)	5.0	1~10
	p-メチルアミノフェノール硫酸塩 (還元剤)	2	0.5~10
	パソクプロイン (Cu ²⁺ 検出剤)	1.0	0.5~10
検出試薬層			
(拡散防止層)	カチオン性ポリマー、ポリマーNo.5	2.0	1.0~10
	酢酸-酢酸ナトリウム (pH4.3) (緩衝剤)	3	0.5~10
	1-メチル-2-ピリジルエチルエタノール (イオン交換単位平均9-10含有) (界面活性剤)	0.5	0.2~4
	脱イオンゼラチン	5	3 ~15
	ビス(2-メチル-2-プロピル-5-フェニル)メタン (硬化剤)	0.05	0.01~0.5
(検出試薬層)	Nitro-PAPS	0.5	0.05~5
	酢酸-酢酸ナトリウム (pH4.3) (緩衝剤)	3	0.5~10
	1-メチル-2-ピリジルエチルエタノール (イオン交換単位平均9-10含有) (界面活性剤)	0.5	0.2~4
	脱イオンゼラチン	5	3 ~15
	ビス(2-メチル-2-プロピル-5-フェニル)メタン (硬化剤)	0.05	0.01~0.5
支持体	ポリエチレンテレフタレート		

(実施例2)

実施例1で作成した乾式分析要素を次のように評価した。

各種濃度の第一鉄イオン標準溶液を1mM HCl 溶液中に調製した。

この各標準10 μ l を上記要素の展開層に接触させて5分後に、波長577nm で要素の支持体側から結果は次の通りであった。

表 2

Fe ²⁺ 濃度	O D _{577nm}
100 μ g/dl	0.630
200	0.660
400	0.720
800	0.836

表2に示すように、非常によい直線性で、Fe²⁺イオンを測定することができた。

最後に本発明の好ましい態様をまとめると、以下の通りである。

- (1) ①キレート試薬Nitro-PAPS及びカチオン性化合物を含有する検出試薬層と、
②第二銅イオンに特異的に配位するキレート剤とを含有する前処理層とを、
備え、前記いずれかの層または他の層に、使用時にpHを3.0 から5.0 の範囲に維持するpH緩衝剤が含有されていることを特徴とする鉄イオン分析用乾式分析要素。
- (2) 前記前処理層には、さらに第二鉄イオンを還元する還元剤が含有されていることを特徴とする
(1) 記載の鉄イオン分析用乾式分析要素。
- (3) 前記pH緩衝剤が、前記検出試薬層に含有されていることを特徴とする(1) 記載の鉄イオン分析用乾式分析要素。
- (4) 前記検出試薬層が、キレート試薬Nitro-PAPSを含有する呈色試薬層と、その上に積層されたカチオン性化合物を含有する拡散防止層とを備えるものであることを特徴とする(1) 記載の鉄イオン分析用乾式分析要素。
- (5) 前記検出試薬層が、キレート試薬Nitro-PAPSを含有する呈色試薬層と、その上に積層されたカチオン性化合物を含有する拡散防止層とを備えるものであることを特徴とする(5) 記載の鉄イオン分析用乾式分析要素。
- (6) 前記検出試薬層と前記前処理層の間に、さらに光遮蔽層が設けられていることを特徴とする(6) 記載の鉄イオン分析用乾式分析要素。
- (発明の効果)

以上のように本発明の鉄イオン分析用乾式分析要素は、 Cu^{2+} 特異的キレート剤により Cu^{2+} イオンの干渉を排除した。一方、使用時のpHを Zn^{2+} がキレート試薬Nitro-PAPSと錯体形成をしないpH 3~5とすることにより、 Zn^{2+} イオンの干渉を排除したものである。従って、 Cu^{2+} イオンや Zn^{2+} イオンなどの妨害イオンに干渉されずイオン選択性に優れている。また、キレート試薬としてNitro-PAPSを用いたので、検出感度が優れている。さらに、 Fe^{3+} イオンとの反応が早く迅速性にも優れている。

分析用乾式分析要素。

- (5) 前記検出試薬層と前記前処理層の間に、さらに光遮蔽層が設けられていることを特徴とする
(1) 記載の鉄イオン分析用乾式分析要素。
- (6) ①透光性支持体と、
②キレート試薬Nitro-PAPS及びカチオン性化合物を含有する検出試薬層と、
③第二銅イオンに特異的に配位するキレート剤とを含有する前処理層と、
④展開層とを、
順次積層して備え、前記いずれかの層または他の層に、使用時にpHを3.0 から5.0 の範囲に維持するpH緩衝剤が含有されていることを特徴とする鉄イオン分析用乾式分析要素。
- (7) 前記前処理層には、さらに第二鉄イオンを還元する還元剤が含有されていることを特徴とする
(6) 記載の鉄イオン分析用乾式分析要素。
- (8) 前記pH緩衝剤が、前記検出試薬層に含有されていることを特徴とする(6) 記載の鉄イオン分析用乾式分析要素。

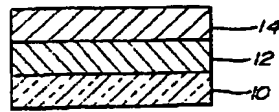
4. 図面の簡単な説明

第1、2、3図はそれぞれ本発明に乾式分析要素の各実施態様の構成図である。

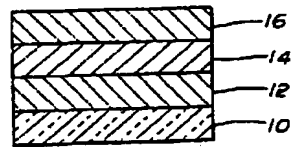
- 10 … 透光性支持体、
- 12 … 検出試薬層、
- 12A … 拡散防止層、
- 12B … 呈色試薬層、
- 14 … 前処理層、
- 16 … 展開層。

特許出願人 富士写真フイルム株式会社
代理人 井理士 山田 文雄
井理士 山田 洋 資

第 1 図



第 2 図



第 3 図

